

枯草菌のカタボライト抑制に関与する *cis* 配列  
(catabolite-responsive elements, *cres* )の機能解析用  
プラスミドベクターの構築

三輪泰彦\*

**Construction of plasmid vector to test catabolite-responsive  
elements (*cres*) of *Bacillus subtilis***

Yasuhiko Miwa

Rep. Res. Inst. Mar. Biores., Fukuyama Univ., (12), 19-25 (2001)

A global regulation of catabolite repression of the genus *Bacillus* comprises negative regulation exerted through the binding of the CcpA protein to the catabolite-responsive elements (*cres*) of the target genes. Computer analysis allows us to search for *cre*-like sequences in the *Bacillus subtilis* genome using consensus sequence. We constructed plasmid vector to examine whether *cre* sequence can function *in vivo*. A single copy integration vector was used for *in vitro* construction of transcriptional fusion to the *lacZ* gene of *E. coli*. A *spac* promoter (*Pspac*)-*cre-lacZ* fusion was constructed in which constitutive promoter *spac* directs  $\beta$ -galactosidase synthesis. To examine known *cre* function, we integrated their fusions into the chromosomal *amyE* locus. Examination of catabolite repression of  $\beta$ -galactosidase synthesis in the integrants lead us to the conclusion that known *cre* sequences can function in the presence of glucose and repression ratio is dependent on the features of *cre* sequence.

**Key words:** *Bacillus subtilis*, catabolite repression

---

海洋生物工学科(Department of Marine Biotechnology, Fukuyama University, Fukuyama 729-0292).

\*Tel: +81-849-36-2111, Fax: +81-36-2459, E-mail: ymiwa@ma.fuma.fukuyama-u.ac.jp

微生物のカタボライト抑制は、培地中にグルコースなどの代謝されやすい炭素源があるとそれを消費するまで代謝されにくい炭素源の分解系の遺伝子発現を抑制する機構であり、炭素源をより効率的に利用するためのグローバルな制御系のひとつである。枯草菌は、孢子形成や抗生物質の生産に関わる遺伝子もカタボライト抑制を受けることが知られている。枯草菌は cAMP をもたないので炭素源のカタボライト抑制は、大腸菌で明らかにされた cAMP-CRP による正の制御系では説明できない。

枯草菌のカタボライト抑制の制御機構はグルコン酸オペロン<sup>1)</sup>、アミラーゼ遺伝子<sup>2)</sup>、グルコースなどの PTS(phosphoenolpyruvate: sugar phosphotransferase system による糖の取り込み系) 糖の輸送に関与するタンパク質<sup>3)</sup>の精力的な研究により明らかになった。すなわち枯草菌のカタボライト抑制には転写制御因子である CcpA タンパク質とグルコースなどの PTS 糖の輸送に係る HPr タンパク質が関与している。この HPr タンパク質のセリン残基が ATP 依存性の HPr キナーゼによりリン酸化され、CcpA タンパク質と複合体を形成し、カタボライト抑制に関与する *cis* 配列 (catabolite-responsive element, *cre*) に結合し、転写抑制および転写伸長妨害を引き起こす。

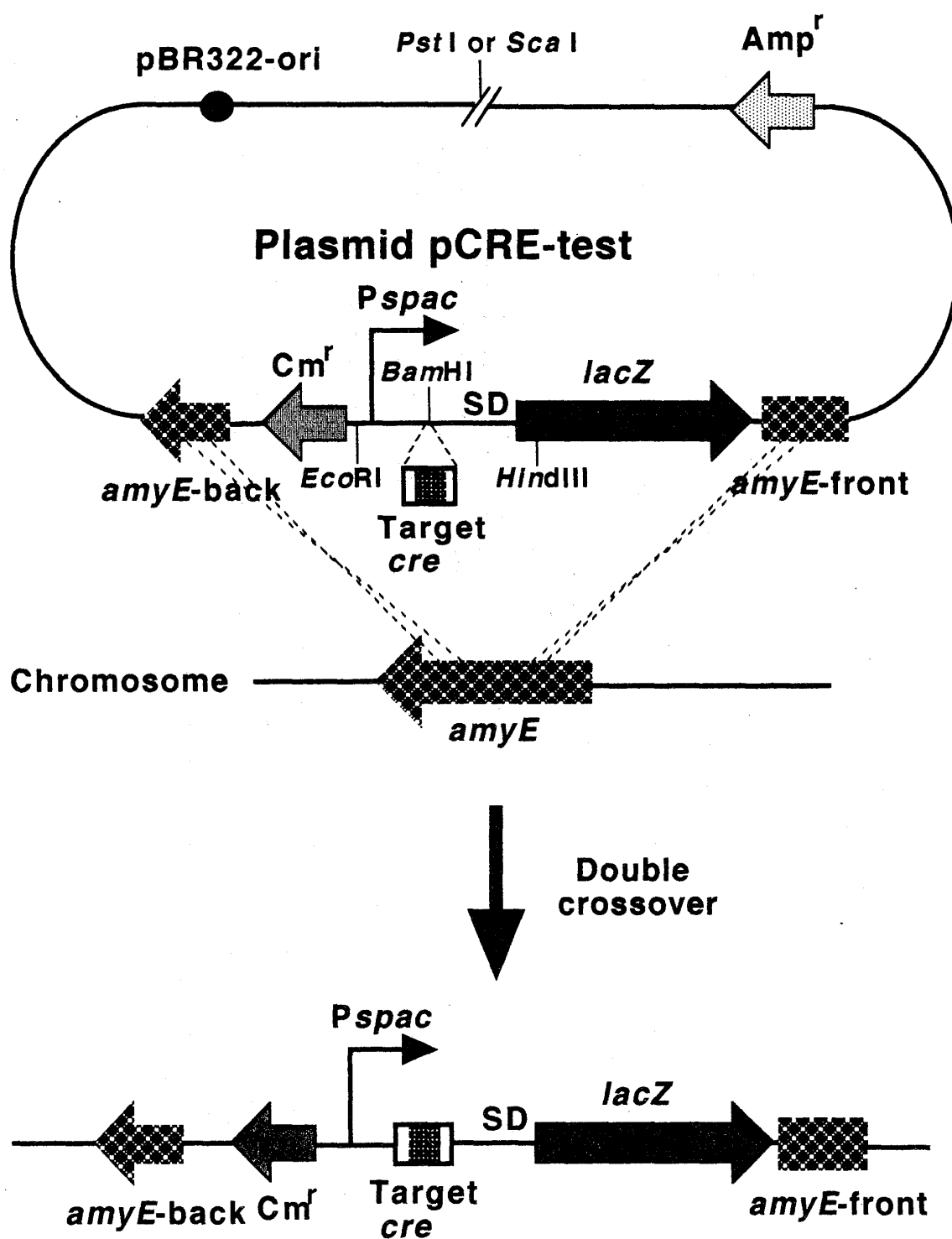
1997 年、枯草菌ゲノムの全塩基配列が決定された後、枯草菌の遺伝子の機能をゲノム全体で解析する研究が展開されるようになった。それに伴ってカタボライト抑制の制御系もゲノムレベルでの研究が可能になった。制御因子 CcpA タンパク質はカタボライト抑制のみならず炭素源の代謝制御の中心的な役割を担っていることから枯草菌全遺伝子 4100 のうち、約 5% に相当する数百の遺伝子が CcpA 支配下にあることが予想される。これらの遺伝子のプロモーター領域の近傍または下流に *cre* 配列が局在すると考えられる。枯草菌のカタボライト抑制に関与する *cre* 配列の共通配列<sup>4,5)</sup>がすでに報告されており、ゲノム配列上から容易に *cre* 類似の配列を検索することができる。

本稿では、機能未知の *cre* の類似配列の機能を簡便かつ定量的に検証するためのプラスミドベクターの構築について報告する。

## 実験方法

**菌株およびプラスミド** プラスミド pCRE-test (Fig. 1) は以下のようにして作製した。プラスミド pAG58<sup>6)</sup> の *spac* プロモーターを含む領域を *EcoRI* と *BamHI* の制限酵素認識部位を付加したプライマーを用いて PCR によって増幅した。さらにプラスミド pMUTIN1<sup>7)</sup> の Shine-Dargano 配列と *lacZ* 遺伝子の 5'-部分 (12 コドン) を含む領域を *BamHI* と *HindIII* の制限酵素認識部位を付加したプライマーを用い、PCR によって増幅した。それぞれの増幅断片を各制限酵素で分解した後、プラスミド ptrpBGI<sup>8)</sup> の *EcoRI* と *HindIII* のベクターと連結した。連結した DNA を用いて大腸菌 JM109 を形質転換した。得られたプラスミド pCRE-test の正しい方向は塩基配列を決定することによって確認した。

**P*spac-cre-lacZ* 転写融合体の *amyE* 遺伝子への導入** カタボライト抑制を受ける遺伝子の *cre* 配列とその上流および下流域を含む周辺配列 (長さ約 30bp) を枯草菌 168 株の染色体 DNA を用いて PCR を行った。PCR 産物を *BamHI* で切断した後、pCRE-test の *BamHI* 切断部位に連結した。連結した DNA を用いて大腸菌 JM109 を形質転換した。クローン化した断片の塩基配列と方向は塩基配列を決定すること



**Fig. 1.** The *in vivo cre* test system of *cre* sequences.

Plasmid pCRE-test was constructed as described in the text. After cloning a fragment carrying each of known and putative *cre* sequences between *Pspac* and *lacZ* in plasmid pCRE-test, the resulting plasmid was linearized with *PstI* or *ScaI* and integrated into the chromosomal *amyE* locus. To examine catabolite repression exerted by target *cre*,  $\beta$ -Gal activities in the integrants grown with and without glucose were determined.

**Table 1.** Catabolite repression of  $\beta$ -Gal synthesis exerted by various known *cre*s and their sequence alignment

| cre <sup>*1</sup> | Region <sup>*2</sup> | $\beta$ -Gal activity <sup>*3</sup><br>(nmol/min per mg protein) |       | Glucose repression |               | cre and its flanking sequence               |
|-------------------|----------------------|--|-------|--------------------|---------------|---|
|                   |                      | - Glc  | + Glc | ratio              | (- Glc/+ Glc) |   |
| none              |                      | 248.8  | 297.2 | 0.8                |               |   |
| ibgIP             | -22/+34              | 227.8  | 28.4  | 8.0                | +1            | CAACACCAAAA ATGAAAGCGTTGACA TCTCAGGAATC +15 |
| hutP              | -25/+51              | 91.1   | 12.7  | 7.2                |               | AGTAGCCGCAA TTGAAACCGCTTCCA AAAAGAGCGGT     |
| gntR              | -31/+50              | 214.6  | 35.8  | 6.0                |               | TTCAGGTCTGA TTGAAAGCGGTACCA TTTTATCAGAA     |
| iAmyE             | -11/+64              | 256.0  | 48.9  | 5.2                |               | GATAATTTTAA ATGTAAGCGTTAACA AAATTCTCCAG     |
| iackA             | -83/+50              | 144.2  | 30.7  | 4.7                |               | ACGACTTCTTA TTGTAAGCGTTATCA ATACGCAAGTT     |
| xyIA              | -30/+145             | 204.7  | 63.4  | 3.2                |               | AATCAACTATT TTGGAAGCGCAAAACA AAGTGGTTTAC    |
|                   |                      |  |       |                    |               | WTGWAANCNTNWCA (consensus for cre)          |

<sup>\*1</sup> Six known *cre*s were examined for their catabolite repressive ability. <sup>\*2</sup> *cre* regions which were cloned into plasmid pCRE-test are indicated; +1 is the first base of each *cre* sequence. <sup>\*3</sup> The Pspac-*cre-lacZ* integrants were grown with and without glucose (Glc). The cells were disrupted, and  $\beta$ -Gal was assayed as described in the text. The  $\beta$ -Gal activities (1 and 0.5 nmol/min per mg protein) in cells of strain GM122 grown with and without glucose, respectively, have been subtracted from the corresponding activities in the integrants.

によって確認した。*spac* プロモーターの転写方向と同一の方向に配置した *cre* 配列をもつプラスミドを  
 による相対的組換えが起こり、クロラムフェニコール耐性 (5  $\mu\text{g/ml}$ ) を示す形質転換体を選択すること  
 により枯草菌の *amyE* 座に *Pspac-cre-lacZ* 転写融合体を導入した (Fig. 1)。さらにクロラムフェニコール  
 耐性を示す形質転換体を 1 % のデンプンを含む Tryptose Blood Agar Base (TBAB, Difco 社) プレート上  
 でヨウ素デンプン反応 (ハロー産生能) を調べることにより確認した。

**枯草菌転写融合体導入株の $\beta$ -ガラクトシダーゼの酵素活性測定法** 枯草菌転写融合体導入株を 10 mM  
 のグルコースと 5  $\mu\text{g/ml}$  クロラムフェニコールを含む TBAB プレート上で 37°C で一晚培養した。0.5% カ  
 ザミノ酸, 50  $\mu\text{g/ml}$  トリプトファン, 5  $\mu\text{g/ml}$  クロラムフェニコールを加えた S6 培地<sup>9)</sup> にグルコースを  
 10 mM 添加した培地と添加しない培地をそれぞれ調製し, 6 ml の入った L 字型試験管に菌を OD<sub>600</sub>=0.02  
 前後になるように植えた。37°C で振とう培養し, OD<sub>600</sub>=0.6 の時に細胞を 6 ml (OD<sub>600</sub>=3.6) 集菌した。  
 細胞をリゾチーム処理, 超音波破碎処理を行い, 溶菌した。粗酵素液中の $\beta$ -ガラクトシダーゼの酵素活  
 性は, 人工基質 ONPG(*o*-ニトロフェニル- $\beta$ -D-ガラクトピラノシド)を用いて測定した。また, 粗抽出液  
 中のタンパク質量は標準タンパク質として牛血清アルブミンを用い, Bradford らの方法<sup>10)</sup> に従って定量  
 した。

## 結果および考察

まず *cre* に類似した配列が生体内で機能するかどうかを決定するためにプラスミド pCRE-test を構築し  
 た (Fig. 1)。*cre* に類似した配列を含む領域をプラスミド pCRE-test の *Bam*HI 切断部位にクローニングし  
 た後, プラスミド DNA を *Pst*I または *Sca*I で直鎖状にし, double crossover による相対的組換えにより枯  
 草菌の *amyE* 座に *Pspac-cre-lacZ* 転写融合体を導入した。*cre* 配列を含まないプラスミド pCRE-test を保  
 持する枯草菌 GM122 株の $\beta$ -ガラクトシダーゼは, 培地中のグルコースの有無にかかわらず構成的に合成  
 された (グルコース抑制率, 0.8, Table 1)。このことから *Pspac-cre-lacZ* 転写融合体の $\beta$ -ガラクトシダーゼ  
 合成のカタボライト抑制を調べることにより *cre* 配列の機能解析が可能になった。

そこでこれまでに同定され, 機能することがわかっている 6 つの *cre* 配列 (グルコン酸資化能<sup>11)</sup>,  
 ヒスチジン資化能<sup>12)</sup>, キシロース資化能<sup>13)</sup>, アリル- $\beta$ -グルコシド資化能<sup>14)</sup>, アミラーゼ遺伝子<sup>4)</sup>,  
 酢酸キナーゼ遺伝子<sup>15)</sup>) をプラスミド pCRE-test にクローニングし, このテストシステムで *cre* 配列が  
 機能するかどうか解析した。すべての *cre* 配列 (*cre-ibgIP*, *cre-hutP*, *cre-gntR*, *cre-iamyE*, *cre-iackA*, *cre-xylA*)  
 が生体内のテストシステムでそれぞれ *cre* として機能した (Table 1)。グルコースの抑制率は *cre* 配列お  
 よびその周辺配列に依存することが示唆された。以上の結果, このテストシステムは *cre* 配列の機能を  
 検証する上で信頼性の高いものであるといえる。

プラスミド pCRE-test を用いて枯草菌ゲノムから *cre* 配列の共通配列をもとに検索した 22 個の機能未  
 知の *cre* に類似した配列の機能を検証することができた<sup>16)</sup>。機能未知の *cre* に類似した配列の機能検証  
 ができれば *cre* が局在する遺伝子は CcpA 支配下にある遺伝子であり, 炭素源の代謝に関与する遺伝子  
 であると推定される。また, このテストシステムで検証した *cre* 配列内に site-directed mutagenesis 法によ

り変異を導入し, *cre* 配列の機能も解析することができる<sup>17)</sup>。

これまでの解析結果から, *cre* の機能解析用プラスミド pCRE-test は枯草菌ゲノム解析のツールの一つとして利用することができるものと期待される。

## 文 献

- 1) Y. Fujita, Y. Miwa, A. Galinier, and J. Deutscher: Specific recognition of the *Bacillus subtilis gnt* cis-acting catabolite- responsive element by a protein complex formed between CcpA and seryl-phosphorylated HPr. *Mol. Microbiol.*, **17**, 953-960, (1995).
- 2) T. M. Henkin, F. J. Grundy, W. L. Nicholson, and G. H. Chambliss: Catabolite repression of  $\alpha$ -amylase gene expression in *Bacillus subtilis* involves a trans-acting gene product homologous to the *Escherichia coli lacI* and *galR*. *Mol. Microbiol.*, **5**, 575-584 (1991).
- 3) J. Deutscher, E. Kuster, U. Bergstedt, V. Charrier, and W. Hillen: Protein kinase-dependent HPr/CcpA interaction links glycolytic activity to carbon catabolite repression in Gram-positive bacteria. *Mol. Microbiol.*, **15**, 1049-1053 (1995).
- 4) M. J. Weickert and G. H. Chambliss: Site-directed mutagenesis of a catabolite repression operator sequence in *Bacillus subtilis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **87**, 6238-6242 (1990).
- 5) Y. Miwa and Y. Fujita: Determination of the cis sequence involved in catabolite repression of the *Bacillus subtilis gnt* operon; implication of a consensus sequence in catabolite repression in the genus *Bacillus*. *Nucleic Acids Res.*, **23**, 7049-7053 (1990).
- 6) K. J. Jaacks, J. Healy, R. Losick, and A. Grossman: Identification and characterization of genes controlled by the sporulation-regulatory gene *spo0H* in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.*, **171**, 4121-4129 (1989).
- 7) V. Vagner, E. Dervyn, and S. D. Ehrlich: A vector for systematic gene inactivation in *Bacillus subtilis*. *Microbiology*, **144**, 3097-3104 (1998).
- 8) H. Shimotsu and D. J. Henner: Construction of a single-copy integration vector and its use in analysis of regulation of the *trp* operon of *Bacillus subtilis*. *Gene*, **43**, 85-94 (1986).
- 9) Y. Fujita and E. Freese: Isolation and properties of a *Bacillus subtilis* mutant unable to produce fructose-bisphosphatase. *J. Bacteriol.*, **145**, 760-767 (1981).
- 10) M. M. Bradford: A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principles of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, **72**, 248-254 (1976).
- 11) Y. Miwa and Y. Fujita: Promoter-independent catabolite repression of the *Bacillus subtilis gnt* operon. *J. Biochem.*, **113**, 665-671 (1993).
- 12) L. V. Jr. Wray, F. K. Pettengill, and S. H. Fisher: Catabolite repression of the *Bacillus subtilis hut* operon requires a cis-acting site located downstream of the transcription initiation site. *J. Bacteriol.*, **176**, 1894-1902 (1994).

- 13) A. C. Kraus, J. Hueck, D. Gartner, and W. Hillen: Catabolite repression of the *Bacillus subtilis xyl* operon involves a *cis* element functional in the context of an unrelated sequence, and glucose exerts additional *xylR*-dependent repression. *J. Bacteriol.*, **176**, 1738-1745 (1994).
- 14) S. Kruger and M. Hecker: Regulation of the putative *bglPH* operon for the aryl- $\beta$ -glucoside utilization in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.*, **177**, 5590-5597 (1995).
- 15) F. J. Grundy, D. A. Waters, S. H. G. Allen, and T. M. Henkin: Regulation of the *Bacillus subtilis* acetate kinase gene by CcpA. *J. Bacteriol.*, **175**, 7348-7355 (1993).
- 16) Y. Miwa, A. Nakata, A. Ogiwara, M. Yamamoto, and Y. Fujita: Evaluation and characterization of catabolite-responsive elements (*cre*) of *Bacillus subtilis*. *Nucleic Acids Res.*, **28**, 1206-1210 (2000).
- 17) Y. Miwa and Y. Fujita: Involvement of two distinct catabolite-responsive elements in catabolite repression of the *Bacillus subtilis myo*-inositol (*iol*) operon. *J. Bacteriol.*, **183**, 5877-5884 (2001).